

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012  
УДК 616.34-008.311.4-022-036.11-07

С. Р. Айвазян, И. Э. Грановский, В. В. Филиппова, Н. И. Воронцова, В. А. Малов, И. П. Белецкий

## СОВРЕМЕННАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ОСТРЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ ДИАРЕЙНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Кафедра инфекционных болезней, лаборатория геномной инженерии, ГОУ ВПО Первый Московский медицинский университет им. И. М. Сеченова, 119435, Москва, ул. Трубецкая, 8; ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142292, Московская обл., г. Пушкино, ул. Институтская; Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН, 142290, Московская обл., г. Пушкино, просп. Науки, 5; ООО "Генлаб"

Современная этиологическая диагностика острых инфекционных диарейных заболеваний (ОИДЗ) характеризуется непрерывным совершенствованием уже существующих традиционных методов исследования (бактериологического, вирусологического, серологического и паразитологического) и поисками новых, более эффективных направлений диагностики. Примером такого направления может служить молекулярная клиническая диагностика, и в частности методы, основанные на применении полимеразной цепной реакции и различных ее модификаций (гнездная ПЦР, РТ-ПЦР, мультиплексная ПЦР и др.). В последние годы увеличивается опыт применения ПЦР в диагностике острых инфекционных диарейных заболеваний и в России, особенно в диагностике вирусных диарей, вследствие отсутствия альтернативных доступных методов их лабораторной верификации. Однако и в случаях острых диарейных заболеваний бактериальной природы диагностические системы на основе ПЦР имеют заметное преимущество по сравнению с рутинными методами, в частности, в диагностике кампилобактериозов и шигеллезов. Описаны работы зарубежных и отечественных авторов, в которых показана несомненная эффективность различных модификаций ПЦР в этиологической верификации ОИДЗ, что может способствовать более широкому использованию их на практике наряду с традиционными рутинными методами исследования.

Ключевые слова: острые инфекционные диарейные заболевания, сальмонеллез, шигеллез, кампилобактериоз, диагностика, ПЦР, модификации ПЦР

S. R. Ayvazyan, I. E. Granovsky, V. V. Filippova, N. I. Vorontsova, V. A. Malov, I. P. Beletsky

MODERN LABORATORY DIAGNOSTICS OF ACUTE INTESTINAL INFECTIONS.

Federal State budgetary institution of Science Institute of theoretical and experimental biophysics of the Russian Academy of Sciences, 3, Institutskaya str., Pushchino, Moscow region, 142292

Federal State budgetary institution of Science G. K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms of the Russian Academy of Sciences, 5, Nauki prosp., Pushchino, Moscow Region, 142290

Present-day research on etiological diagnostic methods of acute infectious diarrheal diseases can be characterized by continuous improvement of existing examination methods (bacteriological, virological, serological, and parasitological) and by attempts to discover more effective diagnostic techniques. Molecular clinical diagnostics, more specifically, methods based on polymerase chain reaction (PCR) and PCR modifications (nested PCR, RT-PCR, multiplex PCR) can be considered as such techniques. Recently there has been an increasing use of PCR in diagnostics of acute infectious diarrheal diseases in Russia. This method is often used in diagnostics of viral diarrheas due to unavailability of alternative methods of laboratorial verification. On the other hand PCR-based diagnostic methods have a significant advantage over routine diagnostic methods in cases of acute bacterial diarrheal diseases (shigellosis, campylobacteriosis). A number of research papers by foreign and Russian scientists have shown the advantage of using different PCR modifications in etiological verification of acute infectious diarrheas. That may contribute to a wider use of new techniques along with traditional routine diagnostic methods.

Key words: acute infectious diarrheal diseases, salmonellosis, shigellosis, campylobacteriosis, diagnosis, PCR, PCR modifications

На сегодняшний день диагностика инфекционных болезней сохраняет все свои традиционные черты, сформировавшиеся за последние десятилетия, характеризуюсь в то же время непрерывным совершенствованием уже найденных приемов и методов распознавания болезней и поисками новых, более эффективных. Ранний и максимально достоверный диагноз является основой для проведения рациональной и эффективной терапии,

прогнозирования течения и исходов заболевания и служит отправной точкой в проведении адекватных противоэпидемических и профилактических мероприятий [21].

Рутинная лабораторная диагностика острых инфекционных диарейных заболеваний на современном этапе. Этиологическая верификация инфекционного диагноза проводится с помощью бактериологического, вирусологического, серологического и

паразитологического методов лабораторного исследования, которые позволяют провести типирование и идентификацию возбудителей [6, 21]. Все перечисленные выше методы могут использоваться и в диагностике острых инфекционных диарейных заболеваний (ОИДЗ).

Несмотря на постоянное совершенствование материально-технической базы лабораторной диагностики, бактериологические исследования продолжают занимать ведущее место в диагностике инфекционных диарей. Они отличаются специфичностью, обусловленной непосредственным выделением и идентификацией возбудителя с определением его признаков, включая чувствительность к антибактериальным препаратам. Как один из основополагающих факторов, приводящих к успешному выделению чистых культур энтеробактерий, рассматривают правильный, своевременный забор и доставку материала для исследования [18, 34]. Особую значимость приобретает максимально раннее установление возбудителя в случаях, в которых требуется проведение срочных лечебных и противоэпидемических мероприятий, например при массовых заболеваниях в коллективах и семьях, при вспышке внутрибольничной инфекции [23].

Классический бактериологический анализ трудоемок и длителен. Исследование проходит ряд этапов, каждый из которых заканчивается определенным результатом. Традиционное понимание этапности бактериологического исследования подразумевает разделение его по времени (часы, сутки после первичного посева на питательные среды) и последовательное проведение идентификации выделенных культур до вида или варианта в соответствии с современной классификацией микроорганизмов. Окончательный ответ на присутствие в пробе патогенных энтеробактерий может быть получен только после изоляции чистой культуры и ее последующей идентификации по биохимическим и серологическим свойствам [9, 18].

Современные рутинные бактериологические исследования позволяют установить этиологию ОИДЗ в случаях бактериальных инфекций, вызванных ограниченным числом известных патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, которые в общей массе регистрируемых случаев составляют не более трети. Из всего спектра бактериальных возбудителей ОИДЗ лабораторное бактериологическое исследование проводится в основном на шигеллы, сальмонеллы, патогенные эшерихии.

Положительные результаты бактериологических исследований колеблются в широких пределах, составляя, например, для шигелл от 10 до 85% [6, 18]. Значительно реже производится выделение иерсиний. Бактериологический метод выделения иерсиний длительный, имеет невысокую ценность. Выделяемость иерсиний из фекалий при гастроэнтеритах в среднем не превышает 0–3% [2, 18, 24]. Практически не выделяется кампилобактер в связи со сложностью культивирования и отсутствием отечественных питательных сред. Пока не существует единых методов одновременного выделения кампилобактерий и других возбудителей кишечных инфекций, что обуслов-

лено особыми условиями выделения и идентификации кампилобактерий [1, 40, 46, 47].

Таким образом, очевидно, что возможности бактериологических методов имеют существенные ограничения, что не только связано с правилами забора анализов и используемых ингредиентов, но и в существенной степени зависит от особенностей патогенеза развития заболевания. В частности, при иерсиниозах имеется крайне низкий показатель бактериологической верификации, что связано с особенностью внутриклеточной локализации возбудителя и изменением его антигенной структуры в процессе персистенции [24].

Серологические методы диагностики ОИДЗ используют для выявления специфических антител в сыворотке крови больного и нарастания их титров в динамике. В основном это варианты агглютинационных тестов (наиболее широко распространенным среди которых является реакция непрямой гемагглютинации (РНГА)). Однако эти методы не используются для ранней диагностики, они имеют лишь вспомогательное и ретроспективное значение. Следует отметить, что в последние годы даже тогда, когда диагноз шигеллез не вызывал сомнения, диагностически достоверное нарастание титров антител в РНГА отмечено в 7–8% случаев [6]. Серологические исследования при кампилобактериозе, по данным различных зарубежных исследований, также неоднозначны и не могут играть решающей роли в постановке диагноза [35, 47].

К методам экспресс-диагностики относят реакции прямой (РИФ) и непрямой иммунофлюоресценции, которые отличаются относительной простотой постановки и скоростью получения результата. Однако широкого применения они так и не получили, что может быть связано с недостаточной специфичностью результатов, обусловленной, возможно, сходством антигенной структуры патогенных и некоторых непатогенных энтеробактерий, относящихся к нормальной микрофлоре человека [6, 18].

Особую проблему составляет диагностика вирусных гастроэнтеритов. Одним из самых старых методов диагностики является вирусологическое исследование, основанное на изоляции и идентификации вируса из клинического материала, однако трудоемкость, длительность проведения и высокая стоимость метода не позволяют его применять в практической медицине [11]. Количество лабораторных методов, используемых для диагностики вирусных ОИДЗ, непрерывно растет. Различные методы лабораторной диагностики вирусных диарей продолжают широко изучаться и совершенствоваться как в России, так и за рубежом. При этом большинство из них имеют в основном научное и исследовательское значение, а используемые в практических лабораториях методы рутинной диагностики недостаточно информативны и имеют множество недостатков [3, 4, 31, 49].

Паразитологические исследования направлены на выявление очень распространенных как среди детей, так и среди взрослых кишечных паразитов – глистов и простейших (*Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* и др.). Традиционно используется микроскопическое

исследование фекалий, которое не всегда является достоверным, так как не всегда наличие паразитов в организме сопровождается обнаружением их в исследуемом материале [44]. Поэтому данные исследования нужно повторять по нескольку раз (что почти не увеличивает вероятность обнаружения паразитов). Для решения вопроса о паразитах используются также серологические реакции, основанные на выявлении специфических антител (РИФ, реакция связывания комплемента, иммуноферментный анализ), а также косвенные методы диагностики, включающие оценку эпидемиологической вероятности заражения, клинические проявления, отклонения в других анализах (например, эозинофилия в общем анализе крови) [35, 45].

Таким образом, на фоне комплексного использования вышеперечисленных методов и сохраняющегося высокого уровня заболеваемости острыми кишечными инфекциями этиологическая диагностика их во многих случаях поздняя, большинство диарей остаются нерасшифрованными, а число диагностических ошибок достигает 12,2–14,7% и остается стабильным [12]. Поэтому на современном этапе важное значение приобретает выбор доступных, и в то же самое время высокочувствительных и специфических методов исследования [4, 5, 34].

**Современные методы ДНК-диагностики и применение их в практике ОИДЗ.** Развитие медицины и диагностики в частности всегда зависело от прогресса в области фундаментальных наук. Очень часто новое направление в области диагностики возникало в ответ на крупные достижения в области физики, химии, математики, биологии [13]. Примером такого направления может служить молекулярная клиническая диагностика, успехи в которой, достигнутые за последние десятилетия, связаны в основном с применением генно-инженерных методов.

В настоящее время имеется два направления ДНК-диагностики: гибридизационный анализ нуклеиновых кислот и диагностика с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) [9].

Одним из наиболее выдающихся достижений в области молекулярной биологии за последние 25 лет стало открытие ПЦР, что ознаменовалось новым этапом в медицине – широким применением методов молекулярной диагностики на основе ПЦР [8, 26].

Принцип метода ПЦР, который представляет собой многократный циклический процесс естественной репликации сегмента молекулы ДНК, был разработан Кэри Мюллисом (фирма "Cetus", США) в 1983 г. (за открытие которого он был удостоен Нобелевской премии в области химии). Появлению ПЦР предшествовали такие достижения в молекулярной генетике, как расшифровка нуклеотидных последовательностей геномов ряда микроорганизмов и выделение специфических, открытие фермента ДНК-полимеразы, которые обеспечивают репарацию и репликацию ДНК [8].

Для проведения реакции необходимо синтезировать два праймера, состоящих из 15–30 нуклеотидов, каждый из которых комплементарен участку одной из двух молекул ДНК, примыкающему к выбранному для амплификации сегменту [22]. В настоящее вре-

мя подбор последовательности праймеров обеспечивается автоматически с использованием соответствующих программ, а конструирование праймеров проводится после определения нуклеотидных последовательностей в исследуемой ДНК методом секвенирования. Для анализа сходства испытываемых ДНК с известными нуклеотидными последовательностями используют данные международных компьютерных банков GenBank и EMBL, поставляющих программы анализа DNASUN или DNASIS [9, 10]. Использование термостабильных Taq-ДНК-полимераз, полученных из термофильных бактерий *Thermus aquaticus*, исключает необходимость добавления фермента после каждого цикла копирования и разделения цепей в ходе нагревания. Это позволило сделать процесс ПЦР циклическим и использовать его *in vitro*. Важным фактором воспроизводимости реакции амплификации и обеспечения цикличности процесса путем последовательной смены температуры реакционной смеси является приборное обеспечение. Основной прибор для проведения ПЦР – амплификатор (термоциклер). Такое важное свойство прибора, как активное регулирование, позволяет добиваться достижения нужной температуры реакционной смеси внутри пробирки в значительно более короткие сроки, чем при обычном регулировании. В результате сокращения времени реакции увеличивается время сохранения активности Taq-полимеразы, что позволяет увеличить количество циклов амплификации и снизить риск неспецифического отжига праймеров [9, 19].

Выявление специфичной ДНК в продуктах ПЦР чаще всего проводят при помощи их электрофореза в 2–3% геле агарозы, содержащем бромид этидия (рис. 1).

Другим способом детекции является гибридизация продуктов ПЦР флюоресцентно или радиоактивно меченным зондом – олигонуклеотидом, комплементарным внутренней области размножаемого фрагмента мишени [5, 9].

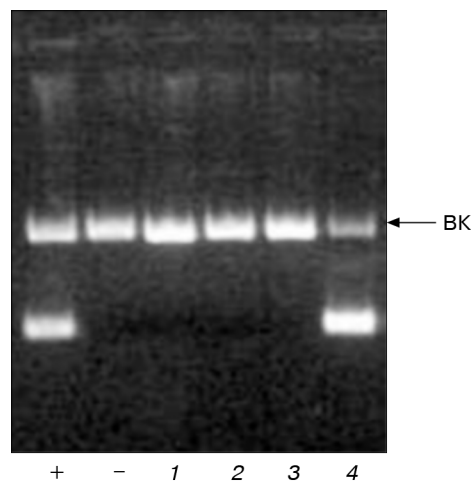


Рис. 1. Детекция продуктов амплификации методом электрофореза в агарозном геле.

+ положительный контроль; - отрицательный контроль; 1, 2, 3 – отрицательные результаты; 4 – положительный результат; ВК – внутренний контроль амплификации.



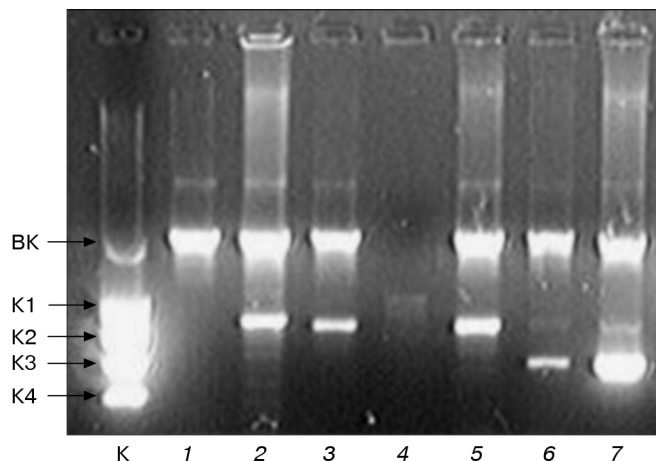


Рис. 2. Детекция продуктов амплификации мультиплексной ПЦР методом электрофореза в агарозном геле.

К – контроль на 4 различных возбудителя; BK – внутренний контроль амплификации; 1 – отрицательный контроль; 2, 3, 5 – положительный результат на K2; 6, 7 – положительный результат на K3; 4 – отсутствует полоса BK – амплификация не прошла.

Такие свойства ПЦР, как высокая специфичность, чувствительность (10–100 клеток в пробе), возможность идентификации внутриклеточных и труднокультивируемых патогенов, универсальность процедуры выделения различных возбудителей и, наконец, высокая скорость получения результатов анализа обуславливают преимущества ПЦР в диагностике инфекционных заболеваний [5, 10].

Метод "классической" направленной ПЦР претерпевает значительные изменения, связанные с разработкой и внедрением различных тест-систем (в том числе и отечественных), применяемых для количественного анализа ДНК (РНК), а также различных модификаций ПЦР (гнездная ПЦР, РТ-ПЦР, мультиплексная ПЦР и др.) и альтернативных методов амплификации нуклеиновых кислот (лигазная цепная реакция) [5, 9].

В частности, мультиплексная ПЦР позволяет проводить реакцию с двумя–четырьмя неперекрывающимися праймерами нескольких возбудителей, что позволяет проверить одну пробу на наличие нуклеиновых кислот сразу нескольких возбудителей. Такой подход уже широко используется в диагностической практике (рис. 2).

Одна из наиболее значимых проблем ПЦР-диагностики – возможность получения ложноположительных результатов вследствие контаминации продуктов реакции. Успехи флуориметрических технологий, а также разработка прибора, который позволяет измерять концентрацию ампликонов непосредственно в ходе реакции, привели к созданию ПЦР в реальном времени [37]. Внедрение этого метода в лабораторную практику позволило отказаться от отдельного этапа регистрации результатов, устранить угрозу контаминации специфическими продуктами реакции, снизить требования к организации лабораторного процесса и решить проблемы количественного определения ампликонов в ходе реакции. Для постановки ПЦР в реальном времени не-

обходимо приборное обеспечение, которое включает амплификатор, флуоресцентный детектор и компьютер. Принцип метода – детекция одновременно с амплификацией путем измерения флуоресцентного сигнала в каждом цикле амплификации. Типы *real-time* PCR различаются по способам генерации репортерной флуоресценции. Одним из основных принципов, лежащим, например, в основе технологии TagMan, является использование меченых зондов, комплементарных средней части амплифицируемого фрагмента и несущих флюорофор в 5'-положении и гаситель флюоресценции в 3'-положении [7, 28, 37]. Когда флюорофор и гаситель связаны с олигонуклеотидным зондом, наблюдается лишь незначительная флуоресцентная эмиссия. Во время процесса амплификации за счет 5'-экзонуклеазной активности Taq-полимеразы флюоресцентная метка переходит в раствор, освобождаясь от соседства с гасителем, и генерирует флуоресцентный сигнал, усиливающийся в реальном времени пропорционально накоплению ампликата (рис. 3).

Анализ кинетики флюоресценции в каждой амплификационной ячейке позволяет рассчитывать количество исходной матрицы, используемой в реакции амплификации [5, 7].

Таким образом, данный метод позволяет существенно повысить достоверность ПЦР-анализа, а также значительно сократить трудоемкость исследования, а возможность количественной оценки и одновременного анализа нескольких параметров открывает новые перспективы в генодиагностике [7, 26].

По многочисленным данным различных зарубежных авторов, внедрение ПЦР в диагностику ОИДЗ позволило не только повысить эффективность этиологической расшифровки острых диарейных заболеваний, но и изменить представление об их современной этиологической структуре. Разработаны тест-системы для детекции таких патогенных бактерий кишечной группы, как *Salmonella*

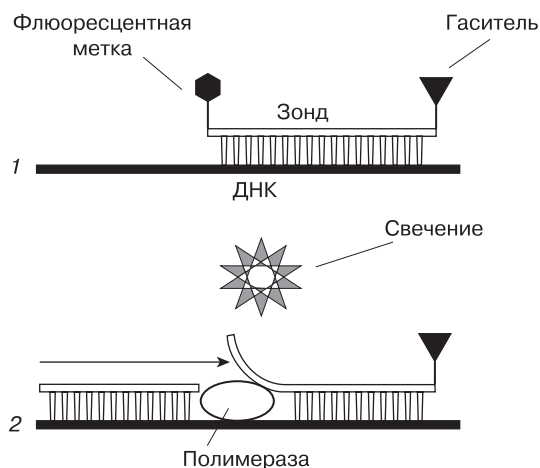


Рис. 3. Схема TaqMan. Количественная ПЦР.

1 – флуоресцентная метка и гаситель связаны с олигонуклеотидным зондом – флуоресцентная эмиссия незначительна; 2 – флуоресцентная метка освобождается от соседства с гасителем – усиление флуоресцентного сигнала.

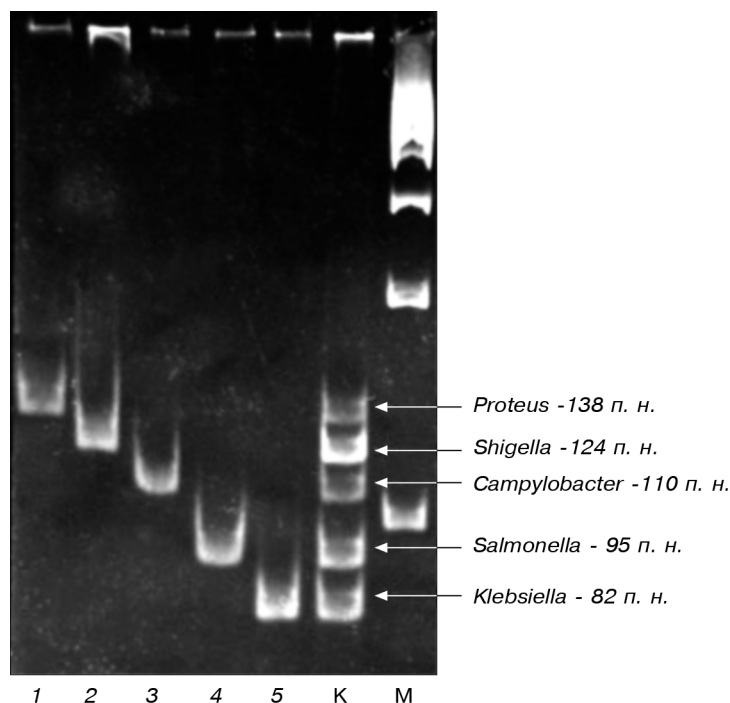


Рис. 4. Разработанная нами мультиплексная тест-система на кишечные бактерии родов *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*. Детекция продуктов амплификации методом электрофореза в акриламидном геле.

1 – + *Proteus*, 2 – + *Shigella*, 3 – + *Campylobacter*, 4 – + *Salmonella*, 5 – + *Proteus*, К – контроль, М – маркер (mix – ДНК-проба на все 5 бактерий).

spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp. [27, 32, 33, 38, 42, 46]. Имеются также работы по разработке ПЦР-диагностики ряда паразитарных кишечных болезней (амебиаз, лямблиоз, криптоспоририоз) [27, 36, 41, 45]. В последние годы увеличивается опыт применения ПЦР в диагностике острых кишечных инфекций и в России [18]. Имеется ряд работ, в которых показана несомненная эффективность ПЦР по сравнению с рутинными методами диагностики ОИДЗ. Особенно наглядно преимущество ПЦР проявляется в диагностике вирусных диарей вследствие отсутствия альтернативных, эффективных и доступных методов их лабораторной диагностики [16, 17]. Однако и в диагностике острых кишечных заболеваний бактериальной природы ПЦР имеет заметное преимущество по сравнению с рутинными методами, в частности в диагностике кампилобактериозов и шигеллезов [2, 12, 16, 27, 33, 38, 39, 48].

Особенностью ОИДЗ является частое развитие вспышечной заболеваемости, что приводит к необходимости проведения экстренных диагностических мероприятий. Другой особенностью течения данных заболеваний является стереотипность клинического течения в дебюте заболеваний, требующая применения широкого спектра диагностических методик, в частности для предотвращения нозокомиального инфицирования. Все перечисленное свидетельствует о необходимости разработок диагностических тест-систем, которые позволили бы в краткие сроки производить единовременное выявление необходимого спектра возбудителей. В настоящее время

этим требованиям в наибольшей степени отвечают диагностические методики, использующие мультиплексную ПЦР при сохранении высокой аналитической чувствительности [14, 25, 30, 36, 39]. В частности, описаны работы по разработке тест-систем для детекции микроорганизмов родов *Salmonella*, *Shigella* и энтероинвазивных *E. coli*, а также *Salmonella*, *Shigella* и *Campylobacter* [25, 30, 36, 39, 41, 48].

Имеются также отечественные разработки тест-систем с гибридационно-флюоресцентной детекцией продуктов амплификации на такие часто выявляемые возбудители, как микроорганизмы родов *Shigella* и ЕИЕС, *Salmonella*, *Campylobacter*. Полученные в ходе данных работ результаты свидетельствуют о возможности эффективного применения метода детекции возбудителей ОИДЗ на основе ПЦР с гибридационно-флюоресцентной детекцией продуктов амплификации [15].

**Заключение.** ОИДЗ остаются одними из самых актуальных инфекционных заболеваний в связи с повсеместной распространенностью, стабильно высокой заболеваемостью и наблюдаемыми в настоящее время качественными изменениями в структуре и характере их течения. Достаточно остро стоит и проблема диагностики ОИДЗ, так как используемые рутинные методы обеспечивают верификацию диагноза лишь в 15–30% случаев, что совершенно не соответствует современному уровню практического здравоохранения. Успешное применение методов ДНК-диагностики в медицине открывает новые возможности и в диагностике острых кишечных инфекций. В связи с непрерывным развитием медицинских технологий, несомненно, будут продолжаться поиск и внедрение в практику современной клинико-диагностической лаборатории ОИДЗ наряду с традиционными рутинными методами новых диагностических систем, более универсальных, экономичных и доступных, но в то же самое время высокочувствительных и специфических.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Воробьев А. А., Сичинский Л. А., Дратвин С. А. Возможности лабораторной диагностики инфекций, вызванных бактериями рода *Campylobacter* // Журн. микробиологии и эпидемиологии. – 2000. – № 1. – С. 95–103.
2. Иванова Л. К., Малявин В. Г., Якунина О. Ю., Каримов Т. В., Чернышова Т. В. Возможность применения иерсиниозных сред обогащения в ПЦР-исследовании // Материалы рос. науч.-практ. конф. "Генодиагностика инфекционных болезней". – М., 2005. – С. 181–182.
3. Игнатюк Т. Е., Голутвин И. А., Насикан Н. С., Иванова О. Е., Еремеева Т. П. Применение атомно-силовой микроскопии для детекции кишечных вирусов // Вопр. вирусол. – 2003. – № 6. – С. 66–69.
4. Ильина Е. Н. Актуальные аспекты типирования микробов и вирусов // Материалы V Всероссийской науч.-практ. конф. "Генодиагностика инфекционных болезней". – М., 2004. – Т. 2. – С. 32–33.
5. Клиническая лабораторная аналитика / Под ред. В. В. Меньшикова. – М., 2003.
6. Клинико-лабораторная диагностика инфекционных болезней: Руководство для врачей. – СПб., 2001. – С. 273–276.
7. Колупаев В. Е. Преимущества метода ПЦР в реальном времени (Real Time PCR) // Сборник тезисов IV Всероссийской науч.-практ. конф. "Генодиагностика инфекционных болезней". – М., 2002. – С. 182–185.

8. *Кэрри Б. Мюллис.* Необычная история о том, как родилась полимеразная цепная реакция // В мире науки. Scientific American). – 1990. – N 6.
9. Медицинские лабораторные технологии / Под ред. А. И. Карпищенко. – СПб., 2002. – Т. 2.
10. Молекулярная клиническая диагностика. Методы: / Под ред. С. Херрингтона и Дж. Макги; Пер. с англ. – М.: Мир, 1999.
11. *Носик Н. Н., Стаханова В. М.* Лабораторная диагностика вирусных инфекций // КМАХ. – Т. 2. – № 2. – С. 25–33.
12. *Орлова К. А., Мазена В. Н., Перфилова Н. В.* и др. Применение комплексного ПЦР-исследования клинического материала для выявления бактериальных возбудителей острых кишечных инфекций // Материалы V Всероссийской науч.-практ. конф. "Генодиагностика инфекционных болезней". – М., 2004. – Т. 2. – С. 94–96.
13. *Пальцев М. А.* Фундаментальные науки и развитие молекулярной медицины // Молекул. мед. – 2003. – № 1. – С. 4–11.
14. *Подколзин А. Т., Яцишина С. Б., Свистунова Т. С.* и др. Разработка диагностической тест-системы для детекции микроорганизмов рода *Salmonella*, *Shigella* и энтероинвазивных *E. coli* на основе мультиплексной ПЦР // Сборник тезисов IV Всероссийской науч.-практ. конф. "Генодиагностика инфекционных болезней". – М., 2002. – С. 236–240.
15. *Подколзин А. Т., Абрамчычева Н. Ю., Фенске Е. Б.* и др. Разработка методик детекции возбудителей ОКИ на основе мультиплексной ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации по "конечной точке" // Материалы Всероссийской науч.-практ. конф. "Генодиагностика инфекционных болезней". – М., 2005. – С. 216–221.
16. *Подколзин А. Т., Мухина А. А., Шипулин Г. А.* и др. Изучение этиологии острых кишечных инфекций у детей, госпитализированных в инфекционные отделения стационаров Москвы // Инфекц. бол. – 2004. – Т. 2, № 4. – С. 85–91.
17. *Подколзин А. Т., Мухина А. А., Шипулин Г. А., Малеев В. В.* Калицивирусная инфекция // Инфекц. бол. – 2004. – Т. 2, № 2. – С. 64–73.
18. *Поздеев О. К., Федоров Р. В.* Энтеробактерии: Руководство для врачей. – М., 2007.
19. *Северин Е. С., Пальцев М. А.* История и современное состояние молекулярной диагностики // Молекул. мед. – 2006. – № 4. – С. 13–25.
20. *Четвертин А. Б., Четвертина Е. Б.* Преодоление проблем ПЦР-диагностики с помощью метода молекулярных колоний // Молекул. мед. – 2003. – № 2. – С. 30–40.
21. *Шувалова Е. П.* Ошибки в диагностике инфекционных болезней: Монография. 4-е изд. – М., 2001. – С. 27.
22. *Эллиот В.* Биохимия и молекулярная биология. Пер. с англ. М., "Наука/Интерперриодика". – 2002.
23. *Ющук Н. Д., Маев И. В., Гуревич К. Г., Бродов Л. Е.* Современные принципы лечения диареи // Тер. арх. – 2002. – № 2. – С. 73–78.
24. *Ющук Н. Д., Шестакова И. В.* Проблемы лабораторной диагностики иерсиниозов и пути их решения // Журн. микробиол. – 2007. – № 3. – С. 61–66.
25. *Aranda K. R., Fagundes-Neto U., Scaletsky I. C.* Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. // J. Clin. Microbiol. – 2004. – Vol. 42, N 12. – P. 5849–5853.
26. *Arnheim N., Erlich H.* Polymerase chain reaction strategy // Annu. Rev. Biochem. – 1992. – Vol. 61. – P. 131–156.
27. *Bounnanh P., Sithivong N.* et al. Pathogenesis of *Shigella* in Healthy Carriers: a Study in Vientiane, Lao People's Democratic Republic // Jpn. J. Infect. Dis. – 2005. – Vol. 58. – P. 232–234.
28. *Buston S. A.* Absolute quantification polymerase chain reaction assays // J. Mol. Endocrinol. – 2000. – Vol. 25. – P. 169–193.
29. Centers for Disease Control and Prevention. Diagnosis and Management of Foodborne Illnesses: a Primer for Physicians // MMWR. – 2001. – Vol. 50, N RR-2. – P. 4.
30. *de Jong A. S., Harbers G. K., Bakkers J. M., Quint W. G. V., van Doorn L. J., Melchers W. J. G.* Multiplex PCR for the detection of bacterial infections in human faeces // 18<sup>th</sup> European Congress of clinical microbiology and infectious diseases. – Barcelona, Spain, 19–22 April. – 2008.
31. *Doane F. W.* Electron microscopy for detection of gastroenteritis viruses. // Viral infection of the gastrointestinal tract. / Ed. A. Z. Kapikian. – 2nd ed. – New York, 1994. – P. 101–130.
32. *Dutta S., Chatterjee A., Dutta P.* et al. Sensitivity and performance characteristics of a direct PCR with stool samples in comparison to conventional techniques for diagnosis of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* infection in children with acute diarrhoea in Calcutta, India // Med. Microbiol. – 2001. – Vol. 50. – P. 667–674.
33. *Eastwood K., Schuster H., Gascoyne-Binzi D.* Comparison of real-time PCR and direct culture for the detection of *Campylobacter* spp. from human faecal samples // 17th European Congress of clinical ICC. – Germany, 31 Mar – 4 Apr, 2007.
34. *Gill C. J., Joseph L., Gorbach S. L., Hamer D. H.* Diagnostic Accuracy of Stool Assays for Inflammatory Bacterial Gastroenteritis in Developed and Resource-Poor Countries // Clin. Infect. Dis. – 2003. – P. 365–375.
35. *Guerrant R. L., Gilder T. V., Steiner T. S., Thielman N. M., Slutsker L., Tauxe R. V.* et al. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea // Clin. Infect. Dis. – 2001. – Vol. 32. – P. 331–350.
36. *Higuchi R., Roy S., Siddique A., Mondal U., Rahman S. M., Mondal D.* et al. Multiplex real-time PCR assay for detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, and *Cryptosporidium* spp. // Am. J. Trop. Med. Hyg. – 2007. – Vol. 76. – P. 713–717.
37. *Higuchi R.* Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions // Biotechnology. – 1993. – N. 11. – P. 1026–1030.
38. *LaGier M. J., Joseph L. A., Passaretti T. V., Musser K. A., Cirino N. M.* A real-time multiplexed PCR assay for rapid detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* // Mol. Cell. Prob. – 2004. – Vol. 18, N 4. – P. 275–282.
39. *Leushner J., Kelly M.* Detection of pathogenic enteric bacteria in stool by multiplex PCR // Qiagennews. – 2000. – N 4.
40. *Nachamkin I.* Chronic effects of *Campylobacter* infection // Microb. Infect. – 2002. – Vol. 4. – P. 399–403.
41. *Ng C. T., Gilchrist C. A., Lance A., Roy S., Haque R., Houpt E. R.* Multiplex real-time PCR assay using Scorpion probes and DNA capture for genotype-specific detection of *Giardia lamblia* on fecal samples // J. Clin. Microbiol. – 2005. – Vol. 43. – P. 1256–1260.
42. *Pachiadakis I., Karavassilis V., Vasdeki A.* et al. Direct detection of *Salmonella* spp. in faecal specimens by real-time PCR assay // 16th European congress of clinical microbiology and infectious diseases. France. – April 1–4, 2006.
43. *Parashar U. D., Bresee J. S., Gentsh J. R., Glass R. I.* Rotavirus // Emerg. Infect. Dis. – 1998. – Vol. 4, N 4. – P. 561–570.
44. *Haque R.* Human Intestinal Parasites // J. Health Populat. Nutr. – 2007. – Vol. 25, N 4. – P. 387–391.
45. *Roy S., Kabir M., Mondal D., Ali I. K., Petri W. A., Jr., Haque R.* Real-time PCR assay for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection // J. Clin. Microbiol. – 2005. – Vol. 43. – P. 2168–2172.
46. *Takahashi M., Koga M., Yokoyama K., Yuki N.* Epidemiology of *Campylobacter jejuni* Isolated from Patients with Guillain-Barre' and Fisher Syndromes in Japan // J. Clin. Microbiol. – 2005. – Vol. 43, N 1. – P. 335–339.
47. *Tam C. C., Rodrigues L. C., O'Brien S. J.* Guillain-Barre' Syndrome Associated with *Campylobacter jejuni* Infection in England, 2000–2001 // Clin. Infect. Dis. – 2003. – Vol. 37. – P. 307–310.
48. *Vidal M., Kruger E., Dura'n C., Lagos R.* et al. Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections // J. Clin. Microbiol. – 2005. – Vol. 43, N 10. – P. 5362–5365.
49. *Yolken R. H., Lennette D. A., Smith T. F., Waner J. L.* Algorithms for detection and identification of viruses // Murray P. R., Baron E. J., Pfaller M. A., Tenover F. C., Tenover R. H., ed. Manual of clinical microbiology. – 7th ed. – 1999. – P. 843–846.

Поступила 16.11.11